

- evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16(2): 333-50.
11. Bruzzone A, Pérez Piñero C, Rojas P, Romanatto M, Gass H, Lanari C, *et al.* α_2 -adrenoceptors enhance cell proliferation and mammary tumor growth acting through both the stroma and the tumor cells. *Current Cancer Drug Targets* 2011.
 12. Bruzzone A, Vanzulli SI, Soldati R, Giulianelli S, Lanari C, Luthy IA. Novel human breast cancer cell lines IBH-4, IBH-6, and IBH-7 growing in nude mice. *J Cell Physiol* 2009; 219(2): 477-84.

LABORATORIO DE SEÑALIZACIÓN EN MELANOMA

El receptor Ror1 y su rol en cáncer

The role of Ror1 receptor in cancer

O receptor Ror1 e seu papel em câncer

Pablo López Bergami

Resumen

Las proteínas Wnt son ligandos que activan señales involucradas en proliferación, supervivencia, adhesión, migración, diferenciación y polaridad celular y como tal están involucradas en una amplia variedad de patologías. A diferencia de la vía Wnt canónica (o dependiente de beta-catenina) la vía no canónica posee numerosas ramificaciones y ha sido muy poco estudiada. Evidencias obtenidas en los últimos años sugieren que la vía Wnt no canónica (a través de Wnt5a) jugaría un importante rol en la progresión de numerosos tipos de tumores, incluyendo melanoma. Tradicionalmente, la mayor parte de la señalización por Wnt ha sido atribuida a la activación de Fzd y LRP. Sin embargo, evidencias más recientes indican que Wnt puede ejercer sus efectos a través de receptores alternativos Ror1 y 2 (receptor huérfano 1 y 2 similar a tirosina quinasa). Estas proteínas son receptores de Tirosina Quinasa con una arquitectura funcional excepcional dentro de su familia ya que son los únicos en poseer dominios Kringle y dominios ricos en serina y treonina en el extremo C-terminal. Originalmente clonados como receptores huérfanos, su caracterización como receptores Wnt es relativamente reciente por lo cual su rol está en proceso de ser elucidado.

Palabras clave: Wnt no-canónico * receptores Ror * cáncer

Summary

Wnts are ligands that stimulate several signal transduction pathways involved in cell proliferation, survival, migration, and differentiation. Wnt pathway mal-

function has been implied in various forms of disease. The most extensively studied Wnt pathway, termed canonical, results in stabilization of β -catenin and activation of gene expression by TCF and LEF transcription factors. However, Wnts can also activate numerous non-canonical pathways which are independent of β -catenin. These non-canonical pathways have been much less studied. Recent evidences suggest that the Wnt non-canonical pathway (via Wnt5a) would play an important role in several types of cancer, including melanoma. The Wnt signaling has usually been related to activation of Fzd and LRP receptors. However, more recent data indicate that Wnt can activate the alternative receptors Ror1 and 2 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 and 2). These proteins belong to the Tyrosine kinase family and have particular functional domain such as the Kringle domains and Serine/Threonine domains at the C-terminal. Originally cloned as orphan receptors, they were more recently characterized as Wnt receptors and their cellular role is being elucidated.

Key words: non-canonical Wnt * Ror receptors * cancer

Resumo

As proteínas Wnt são ligandos que ativam sinais envolvidos em proliferação, sobrevivência, adesão, migração, diferenciação e polaridade celular e como tal estão envolvidas numa ampla variedade de patologias. A diferença da via Wnt canônica (ou dependente de beta-catenina) a via não canônica possui numerosas ramificações e tem sido muito pouco estudada. Evidências obtidas nos últimos anos sugerem que a via Wnt não canônica (através de Wnt5a) teria um importante papel na progressão de numerosos tipos de tumores, incluindo melanoma. Tradicionalmente, a maior parte da sinalização por Wnt tem sido atribuída à ativação de Fzd e LRP. Entretanto, evidências mais recentes indicam que Wnt pode exercer seus efeitos através de receptores alternativos Ror1 e 2 (Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 and 2). Estas proteínas são receptores de Tirosina Quinase com uma arquitetura funcional excepcional dentro de sua família já que são os únicos em possuir domínios Kringle e domínios ricos em serina e treonina no extremo C-terminal. Originalmente clonados como receptores órfãos, sua caracterização como receptores Wnt é relativamente recente pelo qual seu papel está em processo de ser elucidado.

Palavras chave: Wnt não-canônico * receptores Ror * câncer

El melanoma es un grave problema sanitario debido a su creciente incidencia (es el quinto tumor más frecuente), su pésimo diagnóstico en el estadio metastásico y la falta de terapias efectivas. Distintos enfoques terapéuticos han fallado debido, entre otros motivos, a que en este tumor se observa una activación simultánea de varias vías de señalización. El objetivo general de los estudios que lleva adelante nuestro laboratorio es contribuir a mejorar el conocimiento de las vías de transducción de señales activas en melanoma. La suma de estos

esfuerzos, sin duda, resultará en más y mejores alternativas terapéuticas contra esta enfermedad. A continuación se resumen los actuales proyectos del laboratorio.

Proyecto 1: Estudio del rol biológico de la vía de señalización Wnt/Ror1 en melanoma.

Proyecto 2: Caracterización de la vía de señalización Wnt no canónica.

Proyecto 3: Estudio del rol de GDF9 en cáncer.

Proyecto 4: Identificación y caracterización de blancos transcripcionales de STAT3.

Las vías de señalización Wnt no canónico, JAK/STAT3 y TGF- β se encuentran activas en forma constitutiva en melanoma y se ha demostrado su contribución a distintos aspectos del desarrollo y progresión de melanoma.

La vía de señalización Wnt no canónica ha sido muy poco estudiada y los mecanismos biológicos y moleculares involucrados se conocen sólo superficialmente. El primero de los proyectos tiene como objetivo determinar los mecanismos por los cuales la activación de esta vía contribuye al desarrollo y progresión de melanoma. El segundo proyecto complementa al anterior ya que pretende identificar los ligandos Wnt, los receptores y los mediadores celulares involucrados en esta vía de señalización.

GDF9 (*Growth Differentiation Factor 9*) es un miembro de la familia de TGF- β que ha sido caracterizado como un factor de crecimiento ovárico. Sin embargo, hemos observado que GDF9 es sobreexpresado en melanoma y podría contribuir al desarrollo tumoral. Actualmente, nos encontramos avocados a determinar el rol biológico de este factor de crecimiento en melanoma.

El factor de transcripción STAT3 cumple un importante rol en tumorigénesis. Nuestro objetivo es identificar nuevos blancos transcripcionales de STAT3 y caracterizar sus funciones en el contexto del desarrollo y progresión tumoral. Trabajos realizados en el laboratorio han establecido que la proteína scaffold RACK1 y la proteína quinasa PDK1 son reguladas por STAT3 y al aumentar su expresión incrementan la actividad de otras vías de señalización tales como PKC, JNK y PI3K/Akt.

El receptor Ror1 y su rol en cáncer

La señalización Wnt canónica y no-canónica

Las glicoproteínas Wnt forman una familia de 19 miembros que poseen entre 20% y 85% de identidad de aminoácidos entre sí. Estas proteínas son secretadas y actúan como ligandos extracelulares en forma autócrina y parácrina activando diferentes vías de señalización involucradas en proliferación, adhesión, supervivencia, mi-

gración, diferenciación y polaridad celular (1). Las proteínas Wnt se unen básicamente a tres tipos de receptores de membrana: Frizzled (Fzd o Fz, perteneciente a la familia de Receptores acoplados a proteína G), LRP (*Low-density lipoprotein receptor-related protein*) y ciertos receptores de tirosina quinasa (Ror1, Ror2 y Ryk) (1) (2). La unión de Wnt a sus receptores lleva a la fosforilación y activación de la proteína citosólica Disheveled (Dvl) mediante mecanismos no completamente esclarecidos. Dvl (particularmente Dvl2) juega un rol clave, ya que río abajo de esta proteína la señal se ramifica hacia la denominada vía canónica y múltiples vías no canónicas (1).

La vía canónica involucra la unión de Wnt a receptores de tipo Fzd en presencia de co-receptores LRP. En esta vía, la activación de Dvl estabiliza β -catenina, que de otra manera es ubiquitinada y degradada. β -catenina puede así translocar al núcleo, activar al factor de transcripción Tcf/Lef y regular la expresión de numerosos genes. Más recientemente se ha demostrado que Wnt puede activar vías alternativas, independientes de β -catenina y por lo tanto denominadas no-canónicas. En estos casos, las proteínas LRP no son necesarias y Wnt se une a receptores Fzd y, como se estableció más recientemente, a los de tipo Tirosina Quinasa Ror1/2 o Ryk. El término "vías no canónicas" es utilizado en realidad para referirse a un conjunto numeroso de vías de señalización alternativas, tales como Wnt/calciurina/NFAT, Wnt/PKC, Wnt/CAMKII, Wnt/Rho/ROCK, Wnt/proteína $G_{\beta/\gamma}$ /fosfodiesterasa/cGMP (PDE), Wnt/proteína $G_{\beta/\gamma}$ /fosfolipasa C (PLC) y Wnt/JNK que se activan en respuesta a señales no canónicas (2). Esta sobre-simplificación pone de manifiesto la superficialidad de nuestro conocimiento de estas vías no canónicas. Aspectos tales como los factores que determinan la activación de una vía por sobre las otras o el grado de superposición entre ellas no han sido elucidados aún.

Otro interrogante clave que no ha sido esclarecido aún es porque algunos Wnts inducen alternativamente distintas vías de señalización y regulan aspectos tan diversos de la vida celular en distintos sistemas. Sin dudas, el elevado número de genes intervinientes ha dificultado su estudio. En mamíferos, se han identificado 19 genes Wnt y 10 genes Fzd además de un inusual número de moduladores solubles como sFRP, Dickkopf (Dkk) y WIF1, entre otros. El sistema se torna aún más complejo por el hecho de que varios Fzd pueden actuar como receptores de un Wnt particular y que ciertos Fzd pueden unir varios Wnts. Inicialmente, se consideró que algunos Wnts eran específicos para la vía canónica o no-canónica (por ejemplo, Wnt1, Wnt3a, Wnt3b, Wnt7a y Wnt8 para la canónica y Wnt2, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7b y Wnt11 para la no canónica) pero más recientemente se ha demostrado en forma concluyente que esta especificidad no es tal y que en ciertas circunstancias aún los Wnts considerados "más específicos" pue-

den afectar ambas vías (1). Wnt5a, por ejemplo, además de activar la vía no-canónica suele inhibir la vía canónica. Estas y otras evidencias similares han dado origen a un nuevo paradigma que sostiene que la capacidad de activar una u otra vía no reside solo en los ligandos Wnt sino que además esta dada por el conjunto de receptores expresados por la célula (2).

Los Receptores de Tirosina Quinasa Ror1 y Ror2

Tradicionalmente, la mayor parte de la señalización por Wnt ha sido atribuida a la activación de Fzd y LRP. Sin embargo, evidencias más recientes indican que Wnt puede ejercer sus efectos a través de receptores alternativos como Ryk y Ror. Los receptores Ror1 y Ror2 (Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 and 2) fueron clonados hace 19 años y caracterizados como Receptores de Tirosina Quinasa huérfanos por desconocerse sus ligandos (3). Ror1 y Ror2 poseen 58% de identidad a nivel de aminoácidos y comparten todos sus dominios funcionales. Estos receptores poseen una arquitectura funcional excepcional dentro de su familia ya que son los únicos en poseer dominios Kringle y dominios ricos en Serina y Treonina en el extremo C-terminal. Gracias a estos dominios (involucrados en la formación de uniones proteína-proteína), se especula que estos receptores podrían regular y/o ser regulados por proteínas hasta ahora no involucradas en la señalización por receptores de Tirosina Quinasa. Interesantemente, los dominios de Serina/Treonina se encuentran conservados entre ortólogos de Ror2 pero no entre ortólogos de Ror1. Estudios en roedores demuestran patrones definidos de expresión espaciotemporal de Ror1 y Ror2 en tejidos embrionarios, congruentes con su rol crítico en desarrollo y organogénesis (4). Los diferentes fenotipos observados en estos estudios sugieren que Ror1 y Ror2 cumplen distintos roles en el organismo. Luego del nacimiento estas proteínas dejan de expresarse (4) y no son detectadas en tejidos normales adultos (5).

El descubrimiento en 2003 de que estas proteínas actuaban como receptores de Wnt (a través de su dominio rico en cisteínas, CRD) (6) aumentó el interés en ellas. La mayoría de los estudios hasta la fecha se han focalizado en Ror2. Recientemente, se ha propuesto un modelo por el cual Ror2 (y probablemente también Ror1) cumplirían en la vía no canónica un rol similar al del coreceptor LRP5/6 en la vía canónica (7). De esta manera, distintos Wnt, al unirse con receptores Ror o LRP activarían la vía no canónica o la canónica. De esta manera la competencia de estos coreceptores por Fzd produce una inhibición recíproca. Este modelo resalta la importancia de la expresión diferencial de receptores y permite explicar el hecho de que Ror2 puede activar la vía canónica o la no canónica en distintos tipos celulares. Estas y otras observaciones abonan el concepto de

que la señalización por Wnt es fuertemente dependiente del balance entre los distintos Wnts expresados y sobretodo de la cohorte de receptores en la célula (2). Por razones difíciles de comprender, los trabajos que involucraron a Ror1 son muchísimo menos numerosos que los que tratan sobre Ror2, a pesar de que evidencias genéticas y bioquímicas sugieren que ambos receptores poseen funciones distintas. Por este motivo, se ha profundizado muy poco en las funciones y características de la señalización de este receptor en una célula humana adulta. Se ha demostrado que Ror1 se une a Wnt5a pero no a Wnt3, Wnt5b, o Wnt16 en células HEK293 y que es capaz de activar Rac en respuesta a Wnt5a en células HeLa y L. Se ha descrito que la activación de Ror1 por Wnt5a requiere la fosforilación de Ror1 por GSK3 (7), aunque también se ha descrito la transfosforilación de Ror1 por parte del receptor Met. Recientemente se determinó que Ror1 sufre procesos de glicosilación y mono-ubiquitinación pero no se ha establecido como estos afectan su función.

Participación de Ror1 en cáncer

Las evidencias que proponen un rol de Ror1 en cáncer son escasas aunque muy importantes desde el punto de vista funcional. Debe destacarse sin embargo, que la mayoría de los hallazgos que aquí se describen son muy recientes, reflejando el creciente interés en las funciones de Ror1. Se ha establecido claramente que Ror1 (pero no Ror2) está sobreexpresado en leucemias (5) y cáncer renal. Dada su falta de expresión en tejidos normales adultos se ha propuesto el uso de Ror1 como marcador o como posible blanco terapéutico en leucemia linfocítica crónica (LLC). Mas allá de estos trabajos realizados en leucemias, Ror1 juega un rol importante en la célula tumoral (8). Se ha demostrado que la inhibición de Ror1 mediante RNA de interferencia induce muerte celular en dos tipos de células muy disímiles: HeLa y linfocitos B provenientes de LLC. La inhibición de Ror1 también ha sido asociada a una reducción en la proliferación y en la capacidad tumorigénica de células de carcinoma gástrico y cáncer de pulmón. Se determinó que Ror1 podría intervenir en la activación de la vía Wnt no canónica en metástasis cerebrales de cáncer de mama. Estas observaciones se han producido en paralelo con el reconocimiento del importante rol en cáncer de Ror2 (9). Otro punto a tener muy en cuenta es que el rol de Ror1 debe ser analizado conjuntamente con el de las proteínas Wnt, sus únicos ligandos conocidos. Este aspecto será detallado en la siguiente sección.

La vía Wnt en melanoma

La activación de la vía canónica en melanoma se debe en muchos casos a modificaciones en intermediarios de esta vía como APC e ICAT que llevan a la ac-

tivación y localización nuclear de β -catenina. Los Wnt que más frecuentemente activan esta vía en melanoma son Wnt1 y Wnt3a. Originalmente se consideró que la vía canónica tenía un rol prooncogénico pero en la actualidad su rol se encuentra sujeto a debate (10).

La activación constitutiva de la vía no-canónica, fundamentalmente a través de Wnt5a, también es una característica distintiva de melanoma aunque se desconocen en profundidad los mecanismos moleculares involucrados. La expresión de otros Wnt "no canónicos" asociados a otros tipos de tumores como Wnt2, Wnt4, Wnt7b y Wnt11 no ha sido estudiada en melanoma. Wnt5a se encuentra sobreexpresada en melanoma (presumiblemente por la acción de STAT3) e induce aumentos en la adhesión, motilidad e invasión, la activación de EMT (Transición Epitelial-Mesenquimal), la inhibición de la expresión de supresores de metástasis como Kiss-1 y el aumento de expresión de activadores de metástasis como CD44 (11). Muchos de estos efectos son mediados por la activación de PKC, aunque persisten dudas sobre que isoforma es la involucrada. Sin embargo, debe hacerse notar que algunos de los experimentos en estos trabajos fueron realizados induciendo la sobreexpresión de Wnt5a en células que naturalmente expresaban altos niveles de este ligando, lo cual relativiza el significado de estas conclusiones. Interesantemente, la detección de Wnt5a en biopsias se correlacionó directamente con estadíos más avanzados e inversamente con la sobrevida del paciente. La sobreexpresión de Wnt5a en los tumores es localizada y ocurre en sitios de invasión activa y las células muestran características morfológicas asociadas a un comportamiento agresivo. Los receptores de Wnt5a caracterizados hasta el presente en melanoma son Fzd5 y Ror2. La expresión de este último no solo correlaciona con la de Wnt5a sino que es necesaria para la inducción de metástasis de células B16 dependiente de Wnt5a.

Referencias bibliográficas

1. Rao TP, Kühl M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res* 2010; 106: 1798-806.
2. van Amerongen R, Mikels A, Nusse R. Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci Signal* 2008; 1: re9.
3. Masiakowski P, Carroll RD. A novel family of cell surface receptors with tyrosine kinase-like domain. *J Biol Chem* 1992; 267: 26181-90.
4. Green JL, Kuntz S, Sternberg PW. Ror receptor tyrosine kinases: orphans no more. *Trends Cell Biol* 2008; 18: 536-44.
5. Baskar S, Kwong KY, Hofer T, Levy JM, *et al.* Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase Ror1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 396-404.
6. Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara

B, *et al.* The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* 2003; 8: 645-54.

7. Grumolato L, Liu G, Mong P, Mudbhary R, Biswas R, Arroyave R, *et al.* Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev* 2010; 24: 2517-30.
8. MacKeigan JP, Murphy LO, Blenis J. Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 591-600.
9. O'Connell MP, Weeraratna AT. Hear the Wnt Ror: how melanoma cells adjust to changes in Wnt. *Pigment Cell Melanoma Res* 2009; 22: 724-39.
10. McDonald SL, Silver A.. The opposing roles of Wnt-5a in cancer. *Br J Cancer* 2009; 101: 209-14.
11. O'Connell MP, Fiori JL, Xu M, Carter AD, Frank BP, Camilli TC, French AD, *et al.* The orphan tyrosine kinase receptor, Ror2, mediates Wnt5A signaling in metastatic melanoma. *Oncogene* 2010; 29: 34-44.

LABORATORIO DE PATOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA MOLECULAR

siARN y shARN: Aspectos básicos y aplicados. Su uso como agentes terapéuticos

siRNA and shRNA: basic and applied aspects. Their use as therapeutic agents

siARN e shARN: aspectos básicos e aplicados. Seu uso como agentes terapêuticos

Carolina Flumian, Gabriela Levy, Gabriela Bravo, Carla Gatto Cáceres, Martín Gómez, Adrián Góngora, Alberto Baldi

Resumen

La interferencia del ARN es un fenómeno por el cual pequeñas moléculas de ARN doble cadena inhiben la expresión génica de manera secuencia específica. Esta vía se encuentra altamente conservada en los organismos eucariotas. Existen varios tipos de ARN interferentes, entre ellos se encuentran los shARN (del inglés *short hairpin RNA*) que a su vez, dan lugar a los siARN (del inglés *small interfering RNA*). La activación de esta vía de manera exógena constituye una estrategia prometedora para el tratamiento de múltiples enfermedades humanas tales como el cáncer, las infecciones virales, las enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas. En el presente artículo se realiza la